

La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies

J.A. Godoy¹

(1) Departamento Ecología Integrativa. Estación Biológica Doñana, CSIC. C/ Américo Vespucio, s/n. E-41092 Sevilla, España.

➤ Recibido el 2 de diciembre de 2008, aceptado el 14 de enero de 2009.

Godoy J.A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18(1):23-33.

La presencia de la genética y los marcadores moleculares en la ecología y la biología evolutiva no ha dejado de crecer en las últimas décadas, y la biología de la conservación no ha sido una excepción. Por un lado, estudios teóricos, experimentales y empíricos han documentado los cambios genéticos que las poblaciones sufren como consecuencia de la fragmentación y el declive, y han confirmado las consecuencias negativas que éstos pueden tener para la viabilidad poblacional y la evolución adaptativa. Por otro lado, la aplicación de marcadores moleculares y la rica teoría evolutiva aporta información sobre la historia evolutiva, la demografía, la ecología y el comportamiento de las especies que puede ayudar en la evaluación de riesgos, la asignación de prioridades, la delimitación de unidades y el diseño de estrategias de conservación eficaces. Además, las técnicas moleculares aportan métodos para la asignación de muestras a especies, poblaciones o individuos y para la identificación de sexo que, sobre todo cuando se combinan con materiales obtenidos de manera no invasiva, aportan herramientas eficientes para la conservación y la gestión de especies amenazadas. La presencia de la genética en conservación se ha visto impulsada en los últimos años por la aparición de nuevos marcadores moleculares, el uso de muestras degradadas o antiguas, y por significativos avances en los métodos de análisis de datos que aprovechan desarrollos teóricos importantes como la teoría del coalescente. En particular, el salto a una escala genómica promete salvar la tradicional limitación impuesta por la naturaleza predominantemente neutral de la variación explorada con los marcadores moleculares tradicionales y ofrecer acceso a la base genética de la variación adaptativa. No obstante, la superación de este y otros retos pendientes requerirá un mayor nivel de interacción entre enfoques empíricos, teóricos y experimentales, y entre las disciplinas de la genética y la ecología. La probada importancia de la variación genética para la persistencia de las especies y la sustancial contribución de las técnicas genéticas a la práctica conservacionista demandan una mayor presencia de la genética en la conservación de especies, tanto en sus aspectos normativos como de gestión.

Palabras clave: genética de la conservación, marcadores moleculares, ecología molecular, unidades de conservación, unidades de gestión, diversidad genética, consanguinidad, estructura genética, filogeografía, filogenia.

Godoy J.A. (2009). Genetics, molecular markers and the conservation of species. *Ecosistemas* 18(1):23-33.

Genetics and molecular markers have gained an increasing presence in ecology and evolutionary biology in the last decades, and conservation biology has been no exception. On the one hand, theoretical, experimental and empirical studies have documented the changes occurring in the genetics of populations as these become fragmented and small, and confirmed their negative consequences for population viability and adaptive evolution. On the other hand, the application of molecular markers in conjunction with the rich evolutionary theory yields information on the evolutionary history, the demography, the ecology and the behaviour of particular species, which can assist risk evaluations, the assignment of conservation priorities, the delimitation of conservation and management units and the design of effective conservation strategies. Finally, molecular markers provide methods for the assignment of samples to species, populations or individuals and gender, which –especially when applied to non-invasively collected samples– become effective tools for the conservation and management of endangered species. The presence of genetics in conservation has received a significant boost in recent years from the incorporation of new molecular markers, the increasing use of degraded or ancient materials, and from significant advances in data analyses methods that build upon recent theoretical developments, like coalescent theory. Particularly, the leap to genome-wide analyses promises to overcome the predominantly neutral nature of traditional molecular markers and provide access to the molecular basis of adaptive variation. Nevertheless, overcoming this and other pending challenges will require an increased interaction between theoretical, experimental and empirical approaches and between genetics and ecology. The proved importance of genetics for species persistence and the significant contribution of genetic techniques to conservation practice call for an increased presence of genetics in species conservation, both in policy-making and management.

Key words: conservation genetics, molecular markers, molecular ecology, conservation units, management units, genetic diversity, inbreeding, genetic structure, phylogeography, phylogeny.

La presencia de la genética en general, y de los marcadores moleculares en particular, en las áreas de la ecología y la evolución no ha dejado de crecer en las últimas décadas, como bien pretende ilustrar este número monográfico. El ámbito de la conservación biológica no ha sido una excepción y este proceso ha dado lugar a la disciplina de la *genética de la conservación*. La maduración y consolidación de esta disciplina ha estado marcada por la aparición reciente de varios libros monográficos (Awise y Hamrick 1996; Smith y Wayne 1996; Frankham et al. 2002; Allendorf y Luikart 2007) y una revista científica (*Conservation Genetics*, Springer Netherlands) expresamente dedicados a este tema. Esta revisión pretende ofrecer una visión esquemática del ámbito y el estado actual de la disciplina, con un énfasis en los múltiples usos que los marcadores moleculares ofrecen para el conocimiento y la conservación de la biodiversidad y con ejemplos cercanos de nuestro entorno. Por último, exploraremos los avances recientes y las oportunidades y desafíos que el futuro plantea para esta joven y dinámica disciplina.

El papel de la genética en la conservación

Los antecedentes de la disciplina se pueden retrotraer a las preocupaciones tempranas por el mantenimiento de la diversidad genética en especies explotadas, que fueron trasladadas al ámbito de las especies silvestres con la descripción de diversidad reducida acompañada de problemas reproductivos en especies emblemáticas como el guepardo (O'Brien et al. 1983). La pérdida de potencial adaptativo asociada a la pérdida de diversidad genética, junto a la disminución de eficacia biológica promedio resultante de la acumulación de endogamia y de alelos deletéreos, se identificaron como riesgos de naturaleza genética para la persistencia de las especies. Aunque la importancia de este riesgo frente a otros de naturaleza demográfica y ecológica fue cuestionada al principio (Caro y Laurenson 1994; Caughley 1994), algunos resultados experimentales y cada vez más estudios empíricos indican que tanto la magnitud de estos cambios como sus consecuencias pueden llegar a ser importantes y relevantes para la conservación de las especies (Frankham 2005). Los factores genéticos pueden describirse mejor, por tanto, como ingredientes clave en la receta de factores interactuantes que alimentan el torbellino de la extinción. Más aun, se empieza a reconocer que la trascendencia de la diversidad genética intraespecífica va mas allá de sus efectos sobre la dinámica poblacional, para afectar a la estructura de las comunidades y a los procesos ecosistémicos (Hughes et al. 2008; Whitham et al. 2006; Verdú 2009).

Evaluar el estado genético de las poblaciones y proponer medidas para preservar la diversidad genética y prevenir los riesgos de naturaleza genética para la persistencia de las poblaciones han sido pues objetivos centrales y fundamentales de la genética de la conservación para los que los marcadores moleculares han resultado enormemente útiles. Sin embargo, la aplicación de los marcadores moleculares en conservación no se limita a esto, sino que éstos también pueden contribuir de manera fundamental al entendimiento de la historia evolutiva, la demografía y la ecología de las especies en peligro. Los marcadores moleculares nos permiten describir patrones genéticos en las poblaciones naturales a escalas que van desde individuos a especies. A partir de estos patrones, y aplicando la rica y extensa teoría evolutiva y de genética de poblaciones, podemos hacer inferencias sobre los procesos demográficos y evolutivos que han actuado sobre la especie a distintas profundidades temporales. Es el conocimiento de estos procesos el que debe guiar la delimitación de unidades de conservación, la evaluación de riesgos y el diseño de estrategias de conservación. Por último, los marcadores moleculares aportan herramientas eficientes para la identificación de especies, asignación de individuos a poblaciones, e identificación de individuos que han encontrado numerosas aplicaciones en la práctica conservacionista.

Filogenias, prioridades de conservación y factores de extinción

Los marcadores moleculares, en combinación con métodos de reconstrucción filogenética, han sido utilizados desde hace décadas para la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre especies, con la aspiración última de reconstruir el árbol de la vida (Maddison et al. 2007). En el contexto de la conservación, este tipo de enfoques permiten tomar en consideración las divergencias evolutivas en las medidas de biodiversidad (Faith 2002) e invocar a la distinción filogenética como criterio para asignar prioridades de conservación (e.g. Isaac et al. 2007). Al mismo tiempo las filogenias moleculares han sido utilizadas en combinación con el método comparativo para identificar los correlatos ecológicos de la susceptibilidad a la extinción (e.g. Owens y Bennett 2000).

Historia evolutiva, filogeografía y unidades de conservación

Cuando los métodos filogenéticos adquieren una mayor relevancia para la conservación de especies es cuando se utilizan para analizar las relaciones entre alelos muestreados dentro de las especies. El análisis filogenético de datos intraespecíficos permite reconstruir la genealogía de la especie e investigar aspectos de su historia evolutiva reciente en un contexto geográfico, incluyendo eventos de aislamiento y divergencia, expansión de rango, contacto secundario, etc. (Awise 2000). Estos enfoques han permitido constatar para muchas especies la existencia de unidades intraespecíficas con suficiente divergencia evolutiva como para requerir una conservación independiente (*ESUs*, (Moritz 1994)), o incluso para ser designadas como especies distintas (ver Sáez 2009). El razonamiento subyacente es que las divergencias en secuencias mitocondriales sugieren un periodo de evolución en aislamiento, que puede haber conllevado la evolución de divergencias adaptativas y, eventualmente, aislamiento reproductivo. La posibilidad de que se den divergencias adaptativas en ausencia de aislamiento y

divergencias mitocondriales profundas sin que estas estén acompañadas de divergencias adaptativas, ha llevado en los últimos años a reconocer las limitaciones de los métodos estrictamente moleculares, y a insistir en la necesidad de definiciones de unidades de conservación que consideren explícitamente las divergencias en características ecológicas (e.g. Crandall et al. 2000). La mezcla de linajes divergentes puede acarrear consecuencias negativas para las poblaciones por la posible disrupción de interacciones adaptativas entre genes (intrínsecas) o entre genes y ambiente (extrínsecas), un fenómeno conocido como *depresión por exogamia* (Edmands 2007). Aunque los ejemplos empíricos de este fenómeno son escasos, sobre todo en relación a los abundantes ejemplos de depresión consanguínea, es un fenómeno que ha podido pasar en parte desapercibido por la posibilidad de que se manifieste en una segunda generación, incluso después de haberse observado heterosis en la primera.

En el caso de Europa, los linajes divergentes se han originado típicamente como resultado de periodos de aislamiento en las penínsulas mediterráneas durante los máximos glaciares (Taberlet et al. 1998; Hewitt 1999). En el caso del oso pardo, por ejemplo, se han identificado dos linajes principales, uno oriental y uno occidental, que a su vez se subdivide en dos sublinajes correspondientes a los refugios balcánico e ibérico. Este último parece haber sido el principal responsable de la recolonización posglacial de Europa occidental, y ahora se extiende hasta la península escandinava, donde se encuentra con el linaje oriental (Taberlet y Bouvet 1994; Taberlet et al. 1995). Aunque la interpretación más estricta de los resultados mitocondriales sugiere la separación de los osos ibéricos y balcánicos en dos unidades de conservación, el estado de grave amenaza de las poblaciones ibéricas y la posibilidad de divergencias adaptativas entre los osos ibéricos y los escandinavos llevaron a proponer la reunión de osos ibéricos y balcánicos en una única unidad de conservación (Taberlet y Bouvet 1994), que se materializó con la selección de osos eslovenos, de linaje balcánico, para el reforzamiento de las poblaciones de Pirineo. Es más, el análisis reciente de ADN antiguo de osos en la península ibérica detectó la presencia de haplotipos de los otros linajes en Iberia durante el pleistoceno y el holoceno, sugiriendo la existencia de flujo génico abundante a través de Europa en el pasado (Valdiosera et al. 2008).

Por otro lado, el análisis de la variación mitocondrial en el quebrantahuesos reveló la existencia de dos linajes -africano/oriental y occidental- que divergieron en aislamiento pero que entraron posteriormente en contacto tras la expansión de linaje oriental hacia Europa (Godoy et al. 2004). En este caso, la mezcla natural de los linajes en el pasado, la ausencia de indicios de divergencias adaptativas y la precaria situación de las poblaciones occidentales, aconseja tratar a la especie como una única unidad de conservación y valida la gestión conjunta de los linajes que ya se estaba realizando en el programa europeo de cría en cautividad.

Por último, los estudios filogeográficos también pueden ser útiles en conservación al ayudar a determinar el origen geográfico de invasiones biológicas, lo que resulta clave para limitar y prevenir el problema y para optimizar las medidas de control biológico (Goolsby et al. 2006).

Estructura genética, dispersión y unidades de gestión

Los análisis de estructura genética basados en frecuencias alélicas han dominado con mucho las aplicaciones de marcadores moleculares en ecología y conservación. Estos datos permiten testar la existencia de diferencias significativas en la composición genética de las distintas poblaciones de una especie, y describir el nivel de diferenciación a través de índices de distancia o de fijación. La existencia de estructura para marcadores moleculares permite descartar la panmixia e indica, pues, un cierto grado de aislamiento genético de las poblaciones, pero se ha de ser cuidadoso con la interpretación biológica de estos patrones. Por una parte, el alto nivel de resolución que aportan marcadores hipervariables como los microsatélites puede resultar en una estructura con significación estadística pero no biológica en situaciones en las que esta diferenciación ha sido impulsada exclusivamente por la deriva en poblaciones recientemente aisladas (Hedrick 1999). Esta es la situación en la que se encuentra el águila imperial ibérica y el lince ibérico. La población de Doñana de águila imperial se encuentra levemente diferenciada del resto de poblaciones para marcadores moleculares, incluso en presencia de flujo génico (Martínez-Cruz et al. 2004), pero el análisis de muestras históricas indica que la situación era de panmixia a principios de siglo (Martínez-Cruz et al. 2007). Por otra parte, las dos poblaciones remanentes de lince ibérico en Doñana y Sierra Morena, muestra unos niveles de diferenciación altos para marcadores moleculares, pero tanto los datos moleculares como lo que sabemos de la historia demográfica reciente, que indican la probable conexión de ambas poblaciones en un pasado reciente, sugieren que esto se debe a la acción de la deriva en tiempos recientes en consonancia con los tamaños efectivos y el tiempo desde el aislamiento de cada población (Johnson et al. 2004). Por otra parte, la ausencia de estructura para marcadores neutrales no permite descartar categóricamente la existencia de divergencias adaptativas, debido a la posibilidad de que esta se desarrolle incluso en presencia de abundante flujo génico, aunque esta posibilidad requiera invocar gradientes de selección especialmente intensos (Lenormand 2002). El significado de la estructura genética ha de interpretarse pues con sumo cuidado y en combinación con información sobre la ecología (heterogeneidad ambiental) y la demografía de la especie (cuellos de botella y dispersión).

De hecho, los marcadores moleculares ofrecen una batería de métodos para estimar dispersión, un parámetro poblacional de una enorme relevancia en ecología, biología de poblaciones y conservación, pero que se ha mostrado especialmente difícil de estimar por otros métodos. La aproximación tradicional basada en estimaciones a partir de los índices de diferenciación y la invocación de un modelo de equilibrio migración-deriva ha sido ampliamente criticada por imprecisa y por la improbabilidad del equilibrio en la mayoría de las situaciones naturales que afectan a poblaciones recientemente perturbadas (Neigel 2002; Whitlock y McCauley 1999). Nuevos métodos basados en la teoría del coalescente pretenden ser más precisos al utilizar la información genealógica que los estadísticos resumen no capturan (Beerli y Felsenstein 2001), o permiten eliminar las asunciones de equilibrio (Hey y Nielsen 2004). En todos estos casos las estimas de flujo génico son obtenidas de manera indirecta y reflejan promedios para tiempos evolutivos recientes. No obstante, los marcadores moleculares pueden aportar también estimas de dispersión contemporánea por métodos “directos”. Estos se basan en la observación repetida de un genotipo individual en dos poblaciones distintas (e.g. Palsboll et al. 1997), en la exclusión de todos los potenciales donadores locales de gametos o propágulos (e.g. García et al. 2007), o en la asignación probabilística de los genotipos a poblaciones distintas a las que fueron muestreados (Berry et al. 2004). En base a esta última posibilidad se han desarrollado métodos que simultáneamente infieren el número de grupos genéticos (poblaciones) distintos en una muestra y asignan fraccionalmente los individuos a cada uno de los grupos inferidos, incluso en ausencia de información sobre la población o el lugar en la que fueron muestreados (Mank y Avise 2004).

Las estimas obtenidas por métodos moleculares han permitido investigar algunos de sus condicionantes ecológicos de la dispersión, como rasgos de la historia de vida (Duminil et al. 2007) o la influencia de la matriz del paisaje (Holderegger y Wagner 2008). Este último enfoque permite testar el efecto de barreras potenciales a la dispersión y optimizar el diseño de corredores ecológicos para especies con distribuciones fragmentadas (Epps et al. 2007). Además, estas estimas pueden jugar un papel clave en la delimitación de unidades de gestión, i.e. grupos de poblaciones que, por no ser demográficamente independientes, requieren una gestión conjunta (Palsboll et al. 2007).

Diversidad genética y endogamia: evaluación de riesgos

Evaluar la diversidad genética de las especies en peligro, sopesar los posibles riesgos de naturaleza genética y valorar la oportunidad de acciones de manejo que permitan maximizar la primera y minimizar los segundos son objetivos importantes y asumidos en la genética de la conservación. Los marcadores moleculares han sido utilizados ampliamente para estimar la diversidad genética de las poblaciones. Los datos empíricos revelan un patrón general de menor diversidad en especies amenazadas que en especies hermanas no amenazadas (Spielman et al. 2004). Estas comparaciones entre especies no permiten, sin embargo, determinar si la menor diversidad actual es una consecuencia directa del declive reciente o es una característica intrínseca de la especie. En algunos casos, la disponibilidad de muestras en forma de ejemplares naturalizados que predatan el declive reciente permite distinguir entre estas dos posibilidades. Así se ha podido demostrar que el declive reciente del águila imperial no ha conllevado pérdidas significativas de diversidad nuclear, pero sí de diversidad mitocondrial (Martínez-Cruz et al. 2007), o que la diversidad mitocondrial del quebrantahuesos ha quedado muy mermada como consecuencia de la extinción de poblaciones genéticamente diferenciadas en Europa (Godoy et al. 2004).

La otra gran preocupación en poblaciones en declive es el aumento de la consanguinidad y sus posibles consecuencias negativas para la viabilidad de los individuos y las poblaciones. La ocurrencia de depresión consanguínea se ha documentado ampliamente en poblaciones cautivas y silvestres. Los marcadores moleculares pueden aportar estimas de consanguinidad para poblaciones e individuos, que en algunos casos se han usado para demostrar la ocurrencia de depresión consanguínea en poblaciones silvestres (Keller y Waller 2002). Paradójicamente, la ocurrencia de depresión consanguínea puede ser especialmente difícil de demostrar en poblaciones amenazadas que han pasado por cuellos de botella recientes (Grueber et al. 2008). No obstante, los marcadores moleculares pueden aportar información sobre la historia de vida de la especie y la demografía previa que permita sopesar los riesgos relativos de ocurrencia de depresión consanguínea. En particular, pueden ayudar a detectar la existencia de cuellos de botella en la historia reciente de las poblaciones y estimar los tamaños poblacionales efectivos. El primer tipo de análisis se basa en detectar desviaciones en los patrones genéticos observados respecto a lo esperado en el equilibrio mutación-deriva para una población estable. Por ejemplo, una reducción poblacional intensa conduce a un aumento transitorio de la heterocigosidad respecto a la esperada en el equilibrio mutación-deriva debido a la pérdida preferente de alelos a baja frecuencia, (Luikart et al. 1998), o a una reducción en la relación entre el número de alelos en un microsatélite con respecto a su rango alélico (Garza y Williamson 2001). Más recientemente, se han desarrollado métodos bayesianos basados en la teoría del coalescente para estimar cambios demográficos históricos (Beaumont 1999). De nuevo, la disponibilidad de muestras históricas permite testar de manera más directa la ocurrencia de cuellos de botella e incluso estimar la fecha y tamaño del cuello (Chan et al. 2006). Por último, los patrones genéticos para marcadores moleculares pueden aportar estimas del tamaño efectivo poblacional, parámetro clave para predecir la dinámica genética de la población por efecto de la deriva (Wang 2005).

Herramientas moleculares para la práctica conservacionista

Los marcadores moleculares aportan también métodos eficientes para la asignación de muestras a especies, poblaciones o individuos, los cuales han encontrado múltiples aplicaciones en la práctica conservacionista. Por un lado, es posible asignar muestras a especies de manera no ambigua, incluso a partir de materiales altamente procesados o restos difícilmente identificables, a través de secuenciación de fragmentos informativos y posterior análisis filogenético, o mediante ensayos moleculares diagnósticos. Este tipo de métodos ha permitido constatar la presencia de especies esquivas o de muy baja densidad en áreas concretas a partir de sus restos (Gomez-Moliner et al. 2004; Lopez-Giraldez et al. 2005; Palomares et al. 2002), investigar la identidad taxonómica de los últimos ejemplares de esturiones del Guadalquivir (de la Herran et al. 2004; Gasent et al. 2001) y constatar la comercialización ilegal de productos de especies amenazadas de ballenas o esturiones (Baker et al. 1996; DeSalle y Birstein 1996). La eficiencia de estos los métodos moleculares de identificación de especies ha motivado una propuesta de estandarización y aplicación a gran escala cuyo objetivo es inventariar la vida sobre el planeta (*The Barcode of Life*; Ratnasinghaam y Hebert 2007).

Los marcadores moleculares también aportan herramientas eficientes para la identificación de híbridos entre especies o poblaciones divergentes. Estos métodos han permitido constatar y cuantificar la ocurrencia de hibridación entre lobos y perros (Vila et al. 2003), gatos monteses y domésticos (Oliveira et al. 2008), y entre especies autóctonas y reintroducidas de perdiz (Negro et al. 2001) o malvasia (Muñoz-Fuentes et al. 2007), por ejemplo.

Por otro lado, la asignación genética de individuos a poblaciones promete ser útil en el control de vedas regionales y en la detección de capturas y translocaciones ilegales (Manel et al. 2002), por ejemplo, en especies cinegéticas (Frantz et al. 2006).

A nivel individual las técnicas moleculares permiten asignar género a muestras y restos recurriendo a marcadores ligados a los cromosomas sexuales, existiendo marcadores de amplio espectro tanto para aves (Fridolfsson y Ellegren 1999; Griffiths et al. 1998) como para mamíferos (Buel et al. 1995; Fernando y Melnick 2001; Griffiths y Tiwari 1993). En aves con dimorfismo sexual escaso o nulo estas técnicas previenen emparejamientos de individuos del mismo sexo en los programas de cría en cautividad o asisten en la selección de individuos para reforzamientos. El sexaje molecular del último guacamayo de Spix en libertad a partir de una pluma permitió seleccionar individuos del sexo adecuado para ser liberados como potenciales parejas (Griffiths y Tiwari 1995).

Por último, la aplicación de marcadores hipervariables para la identificación individual a partir de muestras obtenidas por métodos no invasivos, como excrementos, pelos o plumas ha encontrado múltiples aplicaciones para la gestión y conservación de la fauna. La observación de un determinado genotipo en un resto biológico se puede considerar una “captura” o “recaptura” del individuo correspondiente que puede utilizarse para inventariar genéticamente la población, delimitar el uso del espacio por los distintos individuos, y para obtener estimas de parámetros poblacionales que son críticos para un adecuado manejo, como el tamaño poblacional, las distancias de dispersión, las tasas de inmigración, y la contribución de los inmigrantes a la reproducción, por ejemplo (Waits y Paetkau 2005). Esta metodología se está aplicando con éxito al seguimiento de las poblaciones cántabras de osos pardos (Pérez et al. 2009) y de lince ibérico (Godoy et al., datos sin publicar).

Avances recientes y perspectivas de futuro

Numerosos avances recientes tanto en la obtención de datos como en los métodos de análisis han revolucionado la disciplina de la genética de la conservación. Parte de estos progresos están relacionados con la ampliación del tipo de muestras susceptible de ser analizadas con marcadores moleculares. El análisis de restos biológicos que pueden ser colectados de manera no invasiva, como excrementos, pelos o plumas, facilita enormemente el análisis de especies raras o evasivas, y posibilita la monitorización demográfica y genética de las poblaciones (Waits y Paetkau 2005). Por otro lado, las muestras históricas, arqueológicas o paleontológicas ofrecen la oportunidad de análisis genéticos a través del tiempo que permiten testar de manera más directa hipótesis filogeográficas, evolutivas y demográficas (Leonard 2008; Wandeler et al. 2007). Al mismo tiempo, han aumentado tanto el número de marcadores usados como su diversidad. La reconstrucciones filogenéticas y los trabajos filogeográficos han estado dominados en el pasado por el uso exclusivo de marcadores mitocondriales, que presentan algunas ventajas obvias, como su haploidía y ausencia de recombinación, pero también inconvenientes manifiestos, como la presencia de copias nucleares y una posible influencia de la selección mayor de lo esperado (Ballard y Whitlock 2004). Lo que es mas importante, la apreciación de la enorme estocasticidad asociada a los procesos genealógicos han llevado al reconocimiento de la necesidad de incorporar múltiples secuencias nucleares en los análisis de la historia evolutiva de las especies (Knowles y Maddison 2002). La aparición de marcadores que permiten ensayar simultáneamente cientos o miles de loci repartidos por el genoma, como los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) o los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), prometen aumentar la resolución de las inferencias demográficas y facilitar el análisis de la variación adaptativa (ver abajo).

El segundo aspecto que se ha beneficiado de avances significativos recientes es el de los análisis de datos genéticos para las inferencias demográficas y evolutivas. Las inferencias realizadas en filogeografía, que han estado tradicionalmente basadas en la construcción de un árbol o red filogenéticos, la superposición de este sobre un mapa y la reconstrucción de historias filogeográficas “*ad hoc*” compatibles con el árbol, ha pasado por procedimientos de inferencia más explícitos y objetivos como el análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA, (Templeton 1998)), y ha derivado en los últimos años en una apuesta por la incorporación de métodos más explícitamente estadísticos en los que se evalúa la verosimilitud de escenarios filogeográficos alternativos (Knowles 2004). Esto ha sido posible gracias al desarrollo de métodos basados en la teoría del coalescente (Hudson 1990), que permiten relacionar modelos demográficos y árboles de genes incorporando la estocasticidad inherente a los procesos genealógicos. Por otra parte, el análisis de la estructura genética se ha visto fuertemente influenciado por la aparición de algoritmos que permiten inferir el número de poblaciones en la muestra y asignar de manera probabilística cada uno de los individuos, o fracciones de su genoma, a cada uno de estos grupos, incluso obviando la información a priori sobre la población de origen de las muestras o sus coordenadas espaciales (Corander et al. 2004; Pritchard et al. 2000). Todos estos nuevos métodos han hecho un uso creciente de la estadística bayesiana (Beaumont y Rannala 2004) y de algoritmos eficientes, pero computacionalmente demandantes, basados en Monte Carlo y cadenas de Markov (Marjoram y Tavaré 2006).

Perspectiva: retos y oportunidades.

Sin duda, una de las objeciones más habituales al uso de marcadores moleculares en conservación es que al ser supuestamente neutrales no tienen por qué reflejar la variación para caracteres cuantitativos, más directamente relacionada con la adaptación contemporánea o con el potencial de adaptación futura. Las comparaciones de diversidad y diferenciación para marcadores moleculares y para caracteres cuantitativos muestran una correlación positiva significativa, pero en general débil y muy variable entre poblaciones, caracteres y estudios, siendo todavía una cuestión controvertida (McKay y Latta 2002). El análisis molecular de la variación adaptativa es, sin embargo, posible y cada vez más accesible a través de varias estrategias que incluyen el análisis de asociaciones marcador/ambiente, el mapeo de QTLs, el análisis de genes candidatos, los escrutinios genómicos y los análisis de expresión génica (Perfectti et al. 2009; Vasemagi y Primmer 2005). En el contexto de la conservación, el análisis molecular de la variación adaptativa ha estado prácticamente limitado al análisis de variación en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en animales, por su papel clave en la respuesta a patógenos (Piertney y Oliver 2006). La nueva generación de tecnologías de secuenciación genómica (Hudson 2008) promete facilitar sustancialmente la detección de genes responsables de caracteres claves para la eficacia, incluyendo genes deletéreos y genes implicados en adaptaciones locales (Kohn et al. 2006; Ryder 2005). Se ha llegado ya a proponer índices que pretenden medir la diversidad adaptativa de las poblaciones a partir de la frecuencia de genes con señales de selección encontrados en escrutinios genómicos (Bonin et al. 2007).

A pesar de la gran contribución ya realizada por los marcadores moleculares y de las promesas de las nuevas tecnologías de análisis genómico, el progreso de la disciplina y su impacto en la conservación de la biodiversidad podrían beneficiarse de una mayor integración a tres niveles. Una primera necesidad de integración es entre disciplinas: se echa de menos una mayor presencia de la genética cuantitativa y un mayor nivel de interacción con la ecología, necesario como hemos visto para trascender las limitaciones impuestas por la naturaleza neutral de los marcadores moleculares. En este sentido, la genética de la conservación puede verse como un aspecto aplicado de la ecología evolutiva (Latta 2008). Un segundo nivel de integración que podría resultar en avances sustantivos en la disciplina, tanto en sus aspectos fundamentales como en los aplicados, es entre sus hasta ahora generalmente separados enfoques teórico, experimental y empírico (Pertoldi et al. 2007). Por último, la genética de la conservación tiene en gran medida pendiente su integración en la práctica conservacionista, tanto a nivel de legislación como de gestión (Vernesi et al. 2008). Aunque los principios generales como la importancia de preservar la variación interespecífica y respetar las divergencias adaptativas intraespecíficas quedan recogidos generalmente en los enunciados de las leyes de protección de la biodiversidad europeas y nacionales, esto no se traduce en la posibilidad de proteger discontinuidades significativas dentro de las especies al mismo nivel que las especies, como sucede en la legislación estadounidense (Fallon 2007). Por otro lado, la consideración de los aspectos genéticos sigue teniendo escasa relevancia para la conservación de las especies en general y los gestores hacen escaso uso de la información genética disponible. Aunque esto puede interpretarse como un aspecto más de un divorcio difícilmente reconciliable entre ciencia y gestión (Mace y Purvis 2008), en este caso éste puede estar agravado por la tradicional separación curricular entre formación de campo y de laboratorio, en la que la mayoría de los gestores ha quedado del lado de la primera.

No obstante, la situación en nuestro país no es del todo desalentadora. Muchas de las Estrategias de Conservación de Especies Amenazadas ya aprobadas, incluidas las del oso pardo, el águila imperial ibérica, el quebrantahuesos, el urogallo y el lince ibérico, hacen mención expresa a los riesgos de empobrecimiento genético y reconocen la necesidad de información genética que guíe las actuaciones de conservación y gestión. En el caso del lince ibérico, las preocupaciones sobre la escasa diversidad y los riesgos de depresión por consanguinidad de la población de Doñana han motivado ya acciones de translocación que se iniciaron en 2007 con el traslado de un macho desde Sierra Morena que produjo las primeras camadas mixtas nacidas en libertad en la primavera de 2008.

La genética de la conservación y la aplicación de marcadores moleculares son ya elementos a los que no nos podemos permitir renunciar en nuestros esfuerzos por entender y conservar la biodiversidad. Afrontar los enormes retos que el futuro nos depara exigirá, entre otras muchas cosas, un mejor entendimiento de la dinámica de los genes en situaciones de declive, fragmentación y cambios ambientales sin precedentes. Esta tarea sólo será abordable con una verdadera empresa multidisciplinar que exigirá romper las tradicionalmente sólidas barreras entre disciplinas y en la que la genética debe jugar un papel clave.

Referencias

- Allendorf, F.W., Luikart, G. 2007. *Conservation and the genetics of populations* Blackwell, Malden, MA. USA.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*, Harvard University Press, Cambridge, MA. USA.
- Avice, J.C., Hamrick, J.L. 1996. *Conservation genetics: case histories from nature*, Chapman and Hall, New York. USA.
- Baker, C.S., Cipriano, F., Palumbi, S.R. 1996. Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology* 5:671-685.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13:729-744.
- Beaumont, M.A. 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics* 153:2013-2029.
- Beaumont, M.A., Rannala, B. 2004. The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics* 5:251-261.
- Beerli, P., Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Genetics* 98:4563-4568.
- Berry, O., Tocher, M.D., Sarre, S.D. 2004. Can assignment tests measure dispersal? *Molecular Ecology* 13:551-561.
- Bonin, A., Nicole, F., Pompanon, F., Miaud, C., Taberlet, P. 2007. Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology* 21:697-708.
- Buel, E., Wang, G.C., Schwartz, M. 1995. Pcr amplification of animal DNA with human X-Y amelogenin primers used in gender determination. *Journal of Forensic Sciences* 40:641-644.
- Caro, T.M., Laurenson, M.K. 1994. Ecological and genetic factors in conservation: A cautionary tale. *Science* 263:485-486.
- Caughley, G. 1994. Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology* 63:215-244.
- Chan, Y.L., Anderson, C.N.K., Hadly, E.A. 2006. Bayesian estimation of the timing and severity of a population bottleneck from ancient DNA. *Plos Genetics* 2:451-460.
- Corander, J., Waldmann, P., Marttinen, P., Sillanpää, M.J. 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20:2363-2369.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M., Wayne R.K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:290-295.
- de la Herran, R., Robles, F., Martínez-Espin, E., Lorente, J.A., Rejón, C.R., Garrido-Ramos, M.A., Rejón, M.R., 2004. Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and its implication for conservation. *Conservation Genetics* 5:545-551.
- DeSalle, R., Birstein, V.J. 1996. PCR identification of black caviar. *Nature* 381:197-198.
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Salvini, D., Vendramín, G.G., Petit, R.J., 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits?. *American Naturalist* 169:662-672.
- Edmands, S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* 16:463-475.

- Epps, C.W., Wehausen, J.D., Bleich, V.C., Torres, S.G., Brashares, J.S. 2007. Optimizing dispersal and corridor models using landscape genetics. *Journal of Applied Ecology* 44:714-724.
- Faith, D.P. 2002. Quantifying biodiversity: a phylogenetic perspective. *Conservation Biology* 16:248-252.
- Fallon, S.M. 2007. Genetic data and the listing of species under the US endangered species act. *Conservation Biology* 21:1186-1195.
- Fernando, P., Melnick, D.J. 2001. Molecular sexing eutherian mammals. *Molecular Ecology Notes* 1:350-353.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126:131-140.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. UK.
- Frantz, A.C., Pourtois, J.T., Heuertz, M., Schley, L., Flamand, M.C., Krier, A., Bertouille, S., Chaumont, F., Burke, T., 2006. Genetic structure and assignment tests demonstrate illegal translocation of red deer (Cervus elaphus) into a continuous population. *Molecular Ecology* 15:3191-3203.
- Fridolfsson, A.K., Ellegren H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30:116-121.
- García, C., Jordano, P., Godoy J.A. 2007. Contemporary pollen and seed dispersal in a Prunus mahaleb population: patterns in distance and direction. *Molecular Ecology* 16:1947-1955.
- Garza, J.C., Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10:305-318.
- Gasent, J.M., Godoy, J.A., Jordano, P. 2001. Identificación de esturiones procedentes del Gualdalquivir mediante análisis de ADN en especímenes de museo. *Medio Ambiente* 36:44-49.
- Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F., Donazar, J.A. 2004. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (Gypaetus barbatus, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 13:371-390.
- Gómez-Moliner, B.J., Cabria, M.T., Rubines, J., Garin, I., Madeira, M.J., Elejalde, A., Aihartza, J., Fournier, P., Palazón, S., 2004. PCR-RFLP identification of mustelid species: European mink (Mustela lutreola), American mink (M. vison) and polecat (M. putorius) by analysis of excremental DNA. *Journal of Zoology* 262:311-316.
- Goolsby, J.A., De Barro, P.J., Makinson, J.R., Pemberton, R.W., Hartley, D.M., Frohlich, D.R., 2006. Matching the origin of an invasive weed for selection of a herbivore haplotype for a biological control programme. *Molecular Ecology* 15:287-297.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071-1075.
- Griffiths R, Tiwari, B 1993. Primers for the differential amplification of the sex-determining region Y-gene in a range of mammal species. *Molecular Ecology* 2:405-406.
- Griffiths, R., Tiwari, B. 1995. Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* 375:454.
- Grueber, C.E., Wallis, G.P., Jamieson, I.G. 2008. Heterozygosity-fitness correlations and their relevance to studies on inbreeding depression in threatened species. *Molecular Ecology* 17:3978-3984.
- Hedrick, P.W. 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313-318.
- Hewitt, G.M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68:87-112.
- Hey, J., Nielsen, R. 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of Drosophila pseudoobscura and D. persimilis. *Genetics* 167:747-760.

- Holderegger, R., Wagner, H.H. 2008. Landscape genetics. *Bioscience* 58:199-207.
- Hudson, M.E. 2008. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources* 8:3-17.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. En: Futuyma D., Antonovics J. (eds.), *Oxford surveys in evolutionary biology* pp. 5-44. Oxford University Press, Oxford. UK.
- Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T.J., Underwood, N., Vellend, M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11:609-623.
- Isaac, N.J.B., Turvey, S.T., Collen, B., Waterman, C., Baillie, J.E.M. 2007. Mammals on the EDGE: Conservation priorities based on threat and phylogeny. *PLoS ONE* 2:e296.
- Johnson, W.E., Godoy, J.A., Palomares, F., Delibes, M., Fernandes, M., Revilla, E., O'Brien, S.J., 2004. Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity* 95:19-28.
- Keller, L.F., Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17:230-241.
- Knowles, L.L. 2004. The burgeoning field of statistical phylogeography. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1-10.
- Knowles, L.L., Maddison, W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11:2623-2635.
- Kohn, M.H., Murphy, W.J., Ostrander, E.A., Wayne, R.K. 2006. Genomics and conservation genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 21:629-637.
- Latta, R.G. 2008. Conservation genetics as applied evolution: from genetic pattern to evolutionary process. *Evolutionary Applications* 1:84-94.
- Lenormand, T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 17:183-189.
- Leonard, J.A. 2008. Ancient DNA applications for wildlife conservation. *Molecular Ecology* 17:4186-4196.
- López-Giráldez, F., Gómez-Moliner, B.J., Marmi, J., Domingo-Roura, X. 2005. Genetic distinction of American and European mink (*Mustela vison* and *M. lutreola*) and European polecat (*M. putorius*) hair samples by detection of a species-specific SINE and a RFLP assay. *Journal of Zoology* 265:405-410.
- Luikart, G., Sherwin, W.B., Steele, B.M., Allendorf, F.W. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* 7:963-974.
- Mace, G.M., Purvis, A. 2008. Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molecular Ecology* 17:9-19.
- Maddison, D.R., Schulz, K.S., Maddison, W.P. 2007. The tree of life web project. *Zootaxa*, 19-40.
- Manel, S., Berthier, P., Luikart, G. 2002. Detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* 16:650-659.
- Mank, J.E., Avise, J.C. 2004. Individual organisms as units of analysis: Bayesian-clustering alternatives in population genetics. *Genetical Research* 84:135-143.
- Marjoram, P., Tavaré, S. 2006. Modern computational approaches for analysing molecular genetic variation data. *Nature Reviews Genetics* 7:759-770.
- Martínez-Cruz, B., Godoy, J.A., Negro, J.J. 2004. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology* 13:2243-2255.

- Martínez-Cruz, B., Godoy, J.A., Negro, J.J. 2007. Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. *Molecular Ecology* 16:477-486.
- McKay, J.K., Latta, R.G. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution* 17:285-291.
- Moritz, C. 1994. Defining evolutionarily-significant-units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9:373-375.
- Muñoz-Fuentes, V., Vila, C., Green, A.J., Negro, J.J., Sorenson M.D. 2007. Hybridization between white-headed ducks and introduced ruddy ducks in Spain. *Molecular Ecology* 16:629-638.
- Negro, J.J., Torres, M.J., Godoy, J.A. 2001. RAPD analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* x *A. graeca*) in Spain. *Biological Conservation* 98:19-24.
- Neigel J.E. 2002. Is F_{st} obsolete? *Conservation Genetics* 3:167-173.
- O'Brien, S.J., Wildt, D.E., Goldman, D., Merrill, C.R., Bush, M. 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* 221:459-462.
- Oliveira, R., Godinho, R., Randi, E., Ferrand, N., Alves, P.C. 2008. Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conservation Genetics* 9:1-11.
- Owens, I.P.F., Bennett, P.M. 2000. Ecological basis of extinction risk in birds: Habitat loss versus human persecution and introduced predators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12144-12148.
- Palomares, F., Godoy, J.A., Píriz, A., O'Brien, S.J., Johnson W.E. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 11:2171-2182.
- Palsboll, P.J., Allen, J., Berube, M., Clapham, P.J., Feddersen, T.P., Hammond, P.S., Hudson, R.R., Jorgensen, H., Katona, S., Larsen, A.H., Larsen, F., Lien, J., Mattila, D.K., Sigurjonsson, J., Sears, R., Smith, T., Sponer, R., Stevick, P., Oien, N., 1997. Genetic tagging of humpback whales. *Nature* 388:767-769.
- Palsboll, P.J., Berube, M., Allendorf F.W. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution* 22:11-16.
- Pérez, T., Vázquez, F., Naves, J., Fernández, A., Corao, A., Albornoz, J., Domínguez, A., 2009. Non-invasive genetic study of the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos*). *Conservation Genetics* 10:291-301.
- Perfectti, F., Gómez, J.M. Picó, F.X. 2009. La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas* 18(1):10-16.
- Pertoldi, C., Bijlsma, R., Loeschcke, V. 2007. Integrating population genetics and conservation biology: merging theoretical, experimental and applied approaches (Potsdam, Germany). *Conservation Genetics* 8:1267-1268.
- Piertney, S.B., Oliver, M.K. 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 96:7-21.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7:355-364.
- Ryder, O.A. 2005. Conservation genomics: applying whole genome studies to species conservation efforts. *Cytogenetic and Genome Research* 108:6-15.
- Sáez, A.G. 2009. Genes y especies. *Ecosistemas* 18(1):3-9.
- Smith, T.B., Wayne, R.K. 1996. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, Oxford. UK.

- Spielman, D., Brook, B.W., Frankham, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15261-15264.
- Taberlet, P., Bouvet, J. 1994. Mitochondrial-DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 255:195-200.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7:453-464.
- Taberlet, P., Swenson, J.E., Sandegren, F., Bjarvall, A. 1995. Localization of a contact zone between 2 highly divergent mitochondrial-DNA lineages of the brown bear *Ursus arctos* in Scandinavia. *Conservation Biology* 9:1255-1261.
- Templeton, A. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7:381-397.
- Valdiosera, C.E., Garcia-Garitagoitia, J.L., García, N., Doadrio, I., Thomas, M.G., Hanni, C., Arsuaga, J.L., Barnes, I., Hofreiter, M., Orlando, L., Gotherstrom, A., 2008. Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5123-5128.
- Vasemagi, A., Primmer, C.R. 2005. Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Molecular Ecology* 14:3623-3642.
- Verdú, M. 2009. Genética de comunidades. *Ecosistemas* 18(1):17-22.
- Vernesi, C., Bruford, M.W., Bertorelle, G., Pecchioli, E., Rizzoli, A., Hauffe, H.C., 2008. Where's the conservation in conservation genetics? *Conservation Biology* 22:802-804.
- Vila, C., Walker, C., Sundqvist, A.K., Flagstad, O., Andersone, Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellegren, H., 2003. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90:17-24.
- Waits, L.P., Paetkau, D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69:1419-1433.
- Wandeler, P., Hoeck, P.E.A., Keller L.F. 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 22:634-642.
- Wang, J.L. 2005. Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360:1395-1409.
- Whitham, T.G., Bailey, J.K., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Bangert, R.K., Leroy, C.J., Lonsdorf, E.V., Allan, G.J., DiFazio, S.P., Potts, B.M., Fischer, D.G., Gehring, C.A., Lindroth, R.L., Marks, J.C., Hart, S.C., Wimp, G.M., Wooley, S.C., 2006. A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics* 7:510-523.
- Whitlock, M.C., McCauley, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} = 1/(4Nm+1)$. *Heredity* 82:117-125.